

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA  
CELULAR E MOLECULAR)

---

**DNAS REPETITIVOS EM *Melipona scutellaris* (HYMENOPTERA: APIDAE:  
MELIPONIDAE): DISTRIBUIÇÃO CROMOSSÔMICA E TESTE DE  
AMPLIFICAÇÃO DE HETEROCROMATINA MÚLTIPLA OU ÚNICA EM  
*Melipona*.**

**MARIANI CRISTINA ALVES PICCOLI**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração Biologia Celular e Molecular.

MARIANI CRISTINA ALVES PICCOLI

**DNAS REPETITIVOS EM *Melipona scutellaris* (HYMENOPTERA:  
APIDAE: MELIPONIDAE): DISTRIBUIÇÃO CROMOSSÔMICA E  
TESTE DE AMPLIFICAÇÃO DE HETEROCROMATINA  
MÚLTIPLA OU ÚNICA EM *Melipona*.**

Orientador: Prof. Dr. Diogo Cavalcanti Cabral de Mello

Co-orientador: Dra. Vanessa Bellini Bardella

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,  
Universidade Estadual Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre em  
Ciências Biológicas. Área de Concentração:  
Biologia Celular e Molecular.

**Rio Claro  
2017**

591.15 Piccoli, Mariani Cristina Alves  
P591d DNAs repetitivos em *Melipona scutellaris*  
(Hymenoptera:Apidae:Meliponidae): distribuição cromossômica e teste de  
amplificação de heterocromatina múltipla ou única em *Melipona* / Mariani  
Cristina Alves Piccoli. - Rio Claro, 2017  
27 f. : il., figs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Bióciências de Rio Claro  
Orientador: Diogo Cavalcanti Cabral de Mello  
Coorientador: Vanessa Bellini Bardella

1. Genética animal. 2. Sequências repetitivas. 3. Abelhas. 4. FISH. 5.  
DNA repetitivo. 6. Evolução. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

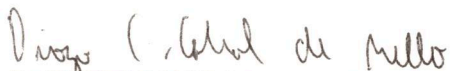
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DNAs REPETITIVOS EM *Melipona scutellaris* (HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONIDAE): DISTRIBUIÇÃO CROMOSSÔMICA E TESTE DE AMPLIFICAÇÃO DE HETEROCROMATINA MÚLTIPLA OU ÚNICA EM *Melipona*.

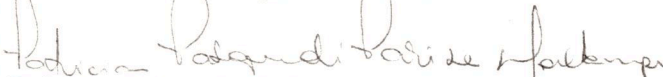
**AUTORA: MARIANI CRISTINA ALVES PICCOLI**

**ORIENTADOR: DIOGO CAVALCANTI CABRAL DE MELLO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. DIOGO CAVALCANTI CABRAL DE MELLO  
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI  
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



Prof. Dr. RICARDO UTSUNOMIA  
Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Rio Claro, 25 de agosto de 2017

*Nem tudo está perdido como parece... sabe, coisas extraordinárias só acontecem a pessoas extraordinárias, vai ver é um sinal que você tem um destino extraordinário, algum destino maior do que você pode ter imaginado.*

*C. W. Lewis*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me guiar em todos os meus caminhos.

A minha família, especialmente a minha mãe que sempre me apoiou e me cobrou para fazer o meu melhor sem nunca perder minha personalidade.

Ao professor Diogo Cavalcanti Cabral de Mello que me recebeu em seu laboratório mesmo eu não tendo experiência na área de citogenética e aceitou me conduzir nessa pesquisa, que mesmo quando eu já estava desanimada sempre tinha uma ideia nova para que pudéssemos continuar. Agradeço também ao professor Diogo por ter colocado essa pessoa maravilhosa que é minha co-orientadora, a Dra. Vanessa Bellini Bardella, que me ensinou tudo o que eu precisava e até mais, transmitindo todo seu conhecimento sem nenhum egoísmo, e que puxou minha orelha nos momentos necessários sempre se preocupando para que eu aprendesse tudo e não só decorasse um protocolo.

Aos meus colegas de laboratório, que apesar da minha introversão fizeram esse ambiente muito mais prazeroso.

Agradeço também ao Sr. Sergio que cuida do biotério da UNESP de Rio Claro que me auxiliou nas coletas das larvas e que me ensinou bastante sobre elas, bem como a Professora Roberta Nocelli da UFSCAR de Araras que me cedeu algumas de suas abelhas. Ao Dr. Eduardo Almeida (USP-Ribeirão Preto/SP) por ceder amostras de algumas espécies. Aos meliponicultores que cederam algumas espécies.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP pela oportunidade que me foi concedida. E agradeço também a CAPES que me auxiliou com a bolsa de estudos que foi de grande importância nessa incrível jornada.

## RESUMO

Os DNAs repetitivos representam uma porção significativa do genoma e podem estar envolvidos com os processos de variação cromossômica e reorganização genômica. Estes DNAs podem ser organizados em tandem ou dispersos, apresentando ampla variabilidade de composição e localização, sendo em muitos casos os principais constituintes da heterocromatina. A utilização dessas sequências como marcadores para a análise da evolução cromossômica é ampla em várias ordens de insetos, enquanto que para as abelhas esse conhecimento ainda é bastante restrito. Na tribo Meliponini o gênero *Melipona* se encontra dividido em quatro subgrupos e é o mais caracterizado cromossomicamente, sendo as espécies do gênero divididas ainda em dois grupos que apresentam marcante diferença na distribuição da heterocromatina. Um grupo é representado por espécies com pouca heterocromatina (principalmente centromérica) enquanto no segundo grupo as espécies apresentam heterocromatina dispersa ao longo de todos os cromossomos. Sendo assim, este gênero apresenta-se como um potencial modelo para estudos de amplificação e diversificação de DNAs repetitivos e sequências heterocromáticas. Neste contexto, utilizamos a espécie *Melipona scutellaris* que possui grande quantidade de heterocromatina nos cromossomos como modelo, buscando entender possíveis causas e eventos evolutivos envolvidos na ampla diferenciação heterocromática. Foram mapeadas distintas sequências de DNAs repetitivos por FISH, tais como DNAr 18S, DNAsn U2 e microssatélites, todos com localização eucromática, sugerindo que as sequências testadas não estão envolvidas com a amplificação da heterocromatina. A fração *Cot*-DNA e DOP-PCR evidenciou que a heterocromatina é composta por sequências altamente repetitivas, enquanto que a hibridização em membrana dessa fração em outras *Meliponas* demonstrou que a heterocromatina dentro do gênero difere de acordo com cada subgrupo.

**Palavras-chave:** Abelhas, FISH, heterocromatina, DNA repetitivo, evolução.

## **ABSTRACT**

Repetitive DNAs represent a significant portion of the genome and may be involved in the processes of chromosome variation and genomic rearrangement. These DNAs can be organized in tandem or dispersed, presenting wide variety of composition and location, being in many cases the main constituents of heterochromatin. An application as sequences as markers for an analysis of chromosomal evolution is broad in several orders of insects, whereas for bees this knowledge is still quite restricted. In the Meliponini tribe, the genus *Melipona* is divided into four subgroups and is the most characteristic chromosomally, being as species of the genus divided into two groups that present a marked differential in the distribution of heterochromatin. One group is represented by species with little heterochromatin (mainly centromeric) while not second group as species presented in heterochromatin dispersed throughout all the chromosomes. Thus, this genus presents itself as a potential model for amplification and diversification studies of repetitive DNAs and heterochromatic sequences. In this context, it uses a species *Melipona scutellaris* that has large amount of heterochromatin in the chromosomes as model, seeking to understand possible evolutionary events involved in the wide heterochromatic differentiation. Different FISH repeating DNA sequences have been mapped, such as 18S rDNA, U2 DNAs and microsatellites, all with eucromatic location, suggesting that as tested sequences are not involved with heterochromatin amplification. The C0t-DNA and DOP-PCR fraction showed that heterochromatin is composed of highly repetitive sequences, whereas a membrane hybridization of this fraction in other *Meliponas* demonstrated that heterochromatin within the genus differs according to each subgroup.

**Key words:** Bees, FISH, heterochromatin, repetitive DNA, evolution.



## SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
1.1 DNAs repetitivos: Uma visão geral .....	7
1.2 Organização cromossômica da tribo Meliponini com ênfase no gênero <i>Melipona</i> .....	11
<b>2.0 OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo geral .....	16
2.2 Objetivos específicos e metas .....	16
<b>3.0 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
3.1 Animais e obtenção de cromossomos .....	17
3.2 Coloração convencional e bandeamentos cromossômicos .....	17
3.3 Extração de DNA e obtenção de DNAs repetitivos por PCR .....	17
3.4 Obtenção da fração <i>Cot</i> e DOP-PCR .....	17
3.5 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente .....	18
3.6 Hibridização Dot-blot .....	19
<b>4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>20</b>
4.1 Capítulo 1: Repetitive DNAs in <i>Melipona scutellaris</i> (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple or unique heterochromatin amplification in <i>Melipona</i> .....	21
<b>5.0 CONCLUSÕES FINAIS .....</b>	<b>22</b>
<b>6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>23</b>

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 DNAs repetitivos: Uma visão geral**

O genoma corresponde ao conjunto de cromossomos de um organismo e é composto por longas moléculas de DNA, sendo esta informação passada ao longo de gerações. Estas moléculas de DNA se organizam nos distintos genomas, podendo ser classificadas estruturalmente ou quantitativamente dependendo do número de cópias. De acordo com o número de cópias as sequências podem ser de cópia única ou moderadamente e altamente repetitivas (CHARLESWORTH et al., 1994; NOWAK, 1994). Principalmente nos Eucariotos, grande parte do DNA nos genomas é repetitiva, sendo esta fração de DNA a principal causa da ampla variabilidade de tamanho genômico observado nas distintas espécies e que contribui efetivamente para a ausência de correlação entre o valor-C (quantidade de DNA por núcleo haplóide) e a complexidade do organismo, fato que ficou conhecido como paradoxo do valor-C (GREGORY, 2002, 2005). Basicamente essa fração de DNA repetitivo é constituída de dois tipos de sequências (i) os elementos arranjados em tandem com cadeias concatenadas uma após a outra, nos quais são incluídos os DNAs satélites (DNAsat), microsatélites, minissatélites e diversas famílias multigênicas e (ii) os elementos repetitivos dispersos, que são representados pelos transposons e retrotransposons que podem ser localizados em regiões específicas ou distribuídos por todo o genoma (CHARLESWORTH et al., 1994; MARTINS, 2007; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012).

O papel definitivo das sequências repetitivas não codificantes ainda por muitos anos permaneceu como um enigma, sendo estas consideradas classicamente como DNA “lixo” (NOWAK, 1994). No entanto, diversos trabalhos têm sugerido que os DNAs repetitivos apresentam ampla funcionalidade e podem inclusive ser transcritos, como

por exemplo distintos DNAs satélites e elementos de transposição envolvidos com surgimento de algumas doenças, na regulação e reparo de genes e na formação da heterocromatina (MEDSTRAND et al., 2005; SHAPIRO; STERNBERG, 2005; STEINEMANN; STEINEMANN, 2005, BIÉMONT; VIEIRA, 2006; KUHN, 2015). Além disso, têm sido demonstrados que tanto as sequências dispersas quanto as repetidas em tandem podem ser de grande importância na organização estrutural e funcional dos genomas (SCHUELER et al., 2001). Além disso, uma das funções mais significativas parece estar relacionada com os segmentos repetitivos dos centrômeros, telômeros e outras regiões heterocromáticas dos cromossomos dos eucariotos (ANLEITNER; HAYMER, 1992; KRAEMER; SCHMID, 1993; SHAPIRO; STERNBERG, 2005;).

Os DNAs satélites são localizados principalmente em regiões heterocromáticas, frequentemente associados às regiões dos centrômeros e regiões terminais dos cromossomos, sendo considerado o principal componente (LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012). Além disso, os DNAs satélites são compostos por sequências de alta repetitividade e grande variabilidade que se organizam em tandem podendo diferir no número de cópias nos genomas de acordo com a espécie, variando em geral entre 1.000 e 100.000 cópias (CHARLESWORTH et al., 1994; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012). Por exemplo, em *Gryllus bimaculatus* Orthoptera, Gryllidae a clivagem do DNA genômico com *Hind*III gerou um fragmento de DNA com 540 bp, que após o isolamento e clonagem foi denominado de GBH535 sendo caracterizado como um DNA satélite (YOSHIMURA et al., 2006). Este clone foi localizado, por meio de hibridizações *in situ* fluorescente, nas regiões distais dos autossomos, as quais correspondem a regiões heterocromáticas (YOSHIMURA et al., 2006). Entretanto, a ausência de sinais de hibridização na heterocromatina intersticial do

cromossomo X sugeriu a presença de outra família de DNA satélite nesse cromossomo (YOSHIMURA et al., 2006). Além disso, a família de DNA satélite GBH353 caracterizada em *G. bimaculatus* foi encontrada em outras espécies do gênero, evidenciando assim, a conservação desta família nas espécies do gênero *Gryllus* (YOSHIMURA et al., 2006). Ainda deve ser considerada a presença de no mínimo uma família de DNA satélite no centrômero de vários eucariotos, sugerindo que tais sequências tenham grande importância na organização cromossômica e na segregação correta dos mesmos durante a divisão celular (PLOHL et al., 2008). Diversos outros exemplos semelhantes ao de *Gryllus bimaculatus* foram documentados em outros eucariotos.

Os VNTRs, ou número variável de repetições em tandem, são uma classe especial de repetições que como o nome já diz, apresentam ainda um número variável em loci diferentes e em organismos individuais diferentes. São também chamados de minissatélites e se encontram dispersos pelo genoma com tamanho variando entre 10-100 pb (JEFFREYS et al., 1985), enquanto os microsatélites, ou *simple sequence repeats* (SSR), que são as menores sequências repetidas, apresentam frequentemente de 1-9 nucleotídeos por unidade de repetição (CHARLESWORTH et al., 1994; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012) e possuem funções envolvidas na regulação de processos metabólicos do DNA, organização da cromatina e regulação da atividade gênica (LI et al., 2002).

Microsatélites são muito variáveis dentro de uma população e ao contrário do observado para os DNAs satélites estes são geralmente encontrados em regiões eucromáticas podendo estar associados também com regiões de heterocromatina constitutiva (CHARLESWORTH et al., 1994; RAMEL, 1997; PLOHL et al., 2008) e já foram localizados em grandes blocos evidentes ou dispersos pelo cromossomo

(MILANI; CABRAL-DE-MELLO, 2014). A acumulação de sequências microssatélites no genoma dos eucariotos é variável e tende a diminuir a partir de vertebrados e plantas seguindo para fungos e invertebrados, sendo fortemente relacionadas com o tamanho do genoma (LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012). Os microssatélites são muito utilizados também para mapeamento genômico e na elucidação de questões biológicas como parentesco, identidade, sexo, epidemiologia e filogeografia (BUSCHIAZZO; GEMMELL, 2006).

Ainda dentro da classificação de DNAs repetitivos, há sequências de elementos repetitivos que podem se propagar no genoma fazendo cópias de si mesmos, os quais podem se mover para outros locais. Tais sequências são chamadas de elementos de transposição (ET) e se dividem em duas classes: os transposons, que se movimentam como DNA e os retrotransposons, que se propagam através da ação da transcriptase reversa (JURKA et al., 2007; FEDOROFF, 2012). A distribuição desses elementos transponíveis nas regiões de heterocromatina e/ou eucromatina é variável entre as espécies. Vemos nos genomas de humano e de rato que tal distribuição é relativamente uniforme na eucromatina e heterocromatina, no entanto, em alguns organismos os transposons e retrotransposons mostram um acúmulo em regiões terminais, pericentroméricas e em outras regiões heterocromáticas (KIDWELL, 2005).

Chamamos de “família multigênica” grupos de genes que segundo Nei e Rooney (2005) tem por origem um ancestral comum e que cujas sequências se assemelham funcionalmente e estruturalmente. Pode-se incluir nas famílias multigênicas, genes codificadores de hemoglobina, imuglobinas, tubilinas, interferons, histonas, RNAs ribossomais e genes de pequenos RNAs nucleares (RNAsn) (NEI; ROONEY, 2005). DNAs ribossomais (DNAr), que transcrevem RNAs ribossomais (RNAr) constituem um dos exemplos mais conhecidos de família multigênica (HILLIS; DIXON, 1991;

EICKBUSH; EICKBUSH, 2007; SMITH et al., 2007). Nos eucariotos (em sua maioria) as sequências de DNAr encontram-se organizadas em dois grupos arranjados em tandem, sendo o menor formado por sequências gênicas que transcrevem o RNAr 5S. Tais sequências são muito conservadas e separadas entre si por sequências não transcritas (NTS - *Non Transcribed Spacer*) (LONG; DAWID, 1980; EICKBUSH; EICKBUSH, 2007). Já o arranjo maior, DNAr 45S, é formado por genes que transcrevem os RNAs ribossomais 18S, 5.8S e 28S, onde cada cluster de DNAr 45S é separado por espaçadores transcritos externos (ETS - *External Transcribed Spacer*) e espaçadores intergênicos (IGS - *Intergenic Spacers*). No entanto, dentro de cada cluster as regiões que transcrevem os RNAs ribossomais 18S, 5.8S e 28S são separadas por espaçadores intergênicos transcritos internos (ITS - *Internal Transcribed Spacer*) (HILLIS; DIXON, 1991; EICKBUSH; EICKBUSH, 2007).

Dentro das famílias multigênicas, também são exemplos sequências que são responsáveis pela produção de pequenos RNAs nucleares (RNAsn) envolvidos nos processos de *splicing* alternativo e que são codificados por uma família multigênica que inclui U1, U2, U4, U5 e U6 (BRINGMANN; LÜHRMANN, 1986; VALADKHAN, 2005; WEST, 2012). Como possuem uma grande importância para o metabolismo celular, os genes RNAsn U constituem uma classe distinta de genes conservados evolutivamente podendo apresentar múltiplas cópias dispersas no genoma, ou podem estar organizados em tandem (BRINGMANN; LÜHRMANN, 1986; VALADKHAN, 2005; WEST, 2012).

## **1.2 Organização cromossômica da tribo Meliponini com ênfase no gênero *Melipona***

As abelhas pertencem à ordem Hymenoptera, que é um dos maiores grupos dentre os insetos (LASALLE; GAULD, 1993). Dentro dessa, a subfamília Meliponinae,

constitui um grupo de abelhas distribuídas principalmente nas regiões tropicais e são divididos em duas tribos: Meliponini e Trigonini (KERR et al., 1996). Essas abelhas são conhecidas popularmente como as abelhas sem ferrão por exibirem o ferrão atrofiado, impossibilitando assim, o uso dessa estrutura (VIT et al., 2013). Os meliponíneos têm grande importância ecológica e econômica atuando como eficientes polinizadores de plantas silvestres e cultivadas (HEARD, 1999; PEDRO, 2014) e também na produção de mel, sendo objeto de vários estudos (CAMARA et al., 2004). As abelhas sem ferrão (Meliponini) compreendem um grande grupo de insetos eusociais com pelo menos 500 espécies descritas nas regiões Pantropical e com mais de 400 espécies agrupadas em 32 gêneros nos neotropicos (CAMARGO, 2013; MICHENER, 2013), sendo que só no Brasil são encontradas 244 espécies distribuídas em 29 gêneros (PEDRO, 2014; TAVARES et al., 2017).

Do ponto de vista cromossômico os estudos na tribo Meliponini iniciaram-se com os trabalhos realizados com os representantes do gênero *Melipona* (KERR, 1948). Atualmente mais de 100 espécies já possuem seus cariótipos descritos basicamente com informação relativa ao número cromossômico e fórmula cariotípica, porém o crescente desenvolvimento de novas técnicas vem possibilitando a descrição de novos dados moleculares, tal como distribuição e localização DNAs repetitivos e conteúdos heterocromáticos (TAVARES et al., 2017). O número cromossômico mais comum entre os meliponíneos é  $n=17$ , sendo o mesmo considerado modal, embora variabilidade com números haploides menores podendo chegar até  $n=8$  tem sido descrita, além de  $n=18$  (ROCHA et al., 2003, 2007; TAVARES et al., 2017).

O gênero *Melipona* possui pelo menos 75 espécies com ancestral comum datando de cerca de 14-17 milhões de anos e taxonomicamente, encontra-se dividido em quatro subgêneros: *Melikerria*, *Melipona*, *Michmelia* e *Eomelipona* (KERR et al., 1967;

MOURE, 1992; MICHENER, 2007; TAVARES, 2017). Embora apenas 24 espécies do gênero já foram estudadas citogeneticamente, este grupo corresponde ao gênero com mais estudos nessa área (ROCHA, et al., 2007). Nesse grupo, número haplóide é conservado, sendo de  $n=9$  (para machos) em 23 espécies (ROCHA et al., 2007; TAVARES et al., 2017). Exceções foram encontradas apenas em *M. seminigra*, que exibiu  $n=11$  (ROCHA et al., 2002, 2007; TAVARES et al., 2017). Além disso, em algumas espécies, tais como *M. quinquefasciata* e *M. rufiventris*, foi relatada a presença de cromossomos supranumerários (ROCHA et al., 2007). A morfologia cromossômica é bastante variável com ocorrência de cromossomos meta, submetá e acrocêntricos nas distintas espécies, embora em algumas delas não seja possível identificar morfologia devido a distribuição da heterocromatina (ROCHA, 2002; ROCHA et al., 2002, ROCHA et al., 2007).

Levando em consideração a distribuição da heterocromatina, Rocha e Pompolo (1998) e Rocha et al. (2002) dividiram as espécies de *Melipona* em dois grupos. Um grupo o qual a heterocromatina encontra-se na região pericentromérica ou no braço curto do único par acrocêntrico enquanto no segundo grupo a heterocromatina se distribui ao longo de todo o cromossomo. Fazem parte do primeiro grupo as espécies *M. marginata*, *M. quadrifasciata*, *M. subnitida*, *M. bicolor*, *M. asilvae*, *M. mandacaia*, *M. puncticolis* e o complemento A de *M. quinquefasciata*. Exceto *M. quinquefasciata*, todas essas espécies pertencem aos subgêneros *Eomelipona* e *Melipona*. Por outro lado, as espécies *M. crinita*, *M. rufiventris*, *M. compressipes*, *M. scutellaris*, *M. fuscopilosa*, *M. capixaba* e *M. captiosa*, *M. fasciculata*, *M. flavolineata*, *M. fuliginosa* e *M. mondory* constituem o segundo grupo e são espécies pertencentes aos subgêneros *Michmelia* e *Melikerria* (ROCHA e POMPOLO, 1998; ROCHA et al., 2002; 2007; TAVARES et al., 2017).



Tavares et al. (2010) evidenciaram que o aumento de quantidade de heterocromatina está diretamente correlacionado com aumento do tamanho genômico nas espécies de *Melipona*. Desse modo, o tamanho genômico médio de espécies com pouca heterocromatina variou de 0.25-0.29 pg, enquanto em espécies com heterocromatina distribuía ao longo de todo o cromossomo é de 0.7-1.38 pg, sugerindo assim, que o aumento da quantidade de heterocromatina está relacionado com o aumento do tamanho genômico nessas abelhas. Quanto a caracterização da riqueza de pares de base, técnicas de coloração sequencial QM/DA/CMA<sub>3</sub>/DAPI demonstram padrões heterogêneos (ROCHA et al., 2002, 2007). Para as espécies com pouca heterocromatina foram diferenciados 6 tipos de bandas em diferentes cromossomos variando entre GC<sup>+</sup> e AT<sup>+</sup>, enquanto que para as espécies com grande quantidade de heterocromatina tal técnica não permite diferenciar os cromossomos, porém a eucromatina e heterocromatina assemelham-se moderadamente ricos em pares de base GC<sup>+</sup> e AT<sup>+</sup> respectivamente (ROCHA et al., 2002, 2007). A localização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) são mais comuns dentro do gênero por meio de nitrato de prata, com poucos trabalhos realizando a localização por meio de hibridizações *in situ* fluorescente (FISH), sendo observados sinais positivos no primeiro par cromossômico entre as melíponas, podendo ser considerado constante independente do grupo ao qual elas pertençam (ROCHA et al, 2002, 2007)

Os marcadores baseados em DNAs repetitivos se mostram ferramentas informativas no entendimento da estrutura e evolução cariotípica e genômica em diversos grupos de insetos, tais como, gafanhotos, besouros, percevejos, mariposas e borboletas (CABRAL-DE-MELLO et al., 2010; MILLANI; CABRAL-DE-MELLO, 2014; BARDELLA et al., 2016), por outro lado, dados relativos a organização desta classe de DNAs nos cromossomos de espécies de abelhas, incluindo os representantes

da tribo Meliponini são bastante escassos. Dados moleculares também vêm ajudando no entendimento da heterocromatina nessas espécies. Lopes et al. (2014) utilizou microdissecção seguida de amplificação DOP-PCR e verificou uma similaridade da heterocromatina em duas espécies de abelhas sem ferrão, observando assim uma homogeneidade da heterocromatina dentro de cada espécie, porém quando comparadas entre si a heterocromatina era diferenciada.

## **2. OBJETIVOS E METAS**

### **2.1 Objetivo geral**

Neste trabalho buscamos compreender a distribuição cromossômica de sequências repetitivas e seu possível relacionamento com eucromatina ou amplificação da heterocromatina no gênero *Melipona*.

### **2.2 Objetivos específicos e metas**

- Caracterizar os cromossomos de *M. scutellaris* utilizando distintas sondas de DNAs repetitivos (fração de DNA  $C_{0t}$ , fração DOP, DNAr 18S, DNAsn U2 e vários microssatélites), testando seu enriquecimento em regiões heterocromáticas ou eucromáticas;
- Isolar o *pool* de DNAs repetitivos de *M. scutellaris* e usá-lo como sonda contra DNA genômico de outras cinco espécies do gênero *Melipona* pertencentes à diferentes subgrupos e com distinta distribuição da heterocromatina, para testar o possível compartilhamento de sequências repetitivas entre as espécies.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais e obtenção de cromossomos**

Foram utilizados cerca de 80 indivíduos da espécie *M. scutellaris* obtidos de caixas de criação alocadas no Biotério do Departamento de Biologia de Rio Claro/SP. As coletas dos discos de larvas foram realizadas entre Agosto de 2015 e Março de 2016.

Para obtenção de cromossomos mitóticos seguimos o protocolo proposto por Imai et al. (1988) utilizando gânglios cerebrais de larvas pós-defecantes. As lâminas foram preparadas através da técnica de maceração seguida de secagem em placa aquecida a 45° C. Foram preparadas aproximadamente 80 lâminas e para realização das análises foram selecionadas lâminas que continham um mínimo de seis metáfases.

#### **3.2 Coloração convencional e bandeamento cromossômico**

A coloração convencional foi realizada com Giemsa 5% para checagem do número cromossômico em dez indivíduos da colônia. Para as análises da heterocromatina foi utilizado o protocolo de bandeamento-C segundo Sumner (1972).

#### **3.3 Extração de DNA e obtenção de DNAs repetitivos por PCR**

Indivíduos adultos foram utilizados para extração de DNA pelo método de Fenol: Clorofórmio, seguindo o protocolo de Sambrook e Russel (2001). Sequências de DNAs repetitivos, tais como famílias multigênicas de DNAr 18S e DNAsn U2, foram isoladas através de PCR utilizando primers previamente publicados. Para o DNAr 18S e o DNAsn U2 foram utilizados os primers descritos por Cabral-de-Mello et al (2010) e Bueno et al. (2013), respectivamente.

#### **3.4 Obtenção da fração *C<sub>0</sub>t* e DOP-PCR**

A técnica de cinética de reassociação (*Cot*) foi realizada de acordo com Zwick et al. (1997) com modificações. Aproximadamente 8µg de DNA foi fragmentado com DNase (Sigma-Aldrich) por 1 minuto. Os fragmentos gerados foram conferidos por eletroforese em gel de agarose a 1%. Em seguida, as amostras foram desnaturadas à 95°C por 10 minutos e submetidas ao gelo por 10 segundos. Após esse processo, as amostras passaram pela temperatura de reassociação de 65°C por 10 minutos. Em seguida, o material foi incubado à 37°C por 8 minutos com S1 nuclease, sendo a reação parada pela adição de nitrogênio líquido. O DNA foi purificado em fenol: clorofórmio (1:1, v:v) sendo o resultado confirmado por eletroforese em gel de agarose 1%. Para a amplificação por *Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR* (DOP-PCR) seguimos o protocolo proposto por Telenius et al. (1992), com pequenas modificações e utilizando o primer degenerado 5'- CCGACTCGACNNNNNNATCTGG.

### **3.5 Hibridização *in situ* fluorescente**

As sequências de DNAs repetitivos obtidas por PCR foram marcadas com digoxigenina 11-dUTP (Roche) ou biotina 11-dATP (Life Technologies) através da *Nick translation* ou PCR, seguindo recomendações do fabricante. As sondas microssatélites (AG<sub>15</sub>, CA<sub>15</sub>, CGG<sub>10</sub>, GAA<sub>10</sub>, GAC<sub>10</sub>, GAG<sub>10</sub>, TAA<sub>10</sub>) foram marcadas diretamente com biotina-14 dATP na própria síntese no extremo 5' (Sigma, St Louis, MO, USA).

A hibridização *in situ* fluorescente seguiu o protocolo descrito por Pinkel et al. (1986), com modificações propostas por Cabral-de-Mello et al. (2010). As sondas foram detectadas usando anti-digoxigenin-Rhodamine (Roche) ou Alexa-fluor-488 conjugada com streptoavidina (Life Technologies). Todas as preparações foram coradas com DAPI e montadas com meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA).

Observamos os sinais da FISH utilizando um microscópio Olympus BX61 equipado com uma lâmpada fluorescente e filtros adequados.

### **3.6 Hibridização Dot-blot**

As análises de hibridização em membrana Dot-Blot foram realizadas seguindo o protocolo descrito por Anjos et al. (2016). Foi utilizada como sonda a fração *Cot*-DNA de *M. scutellaris*. As amostras de DNA genômico isoladas na membrana foram obtidas das seguintes espécies: *M. rufiventris* (*Michmelia*), *M. seminigra* (*Michmelia*), *M. bicolor* (*Eomelipona*), *M. fasciculata* (*Melikerria*) e *M. quadrifasciata* (*Melipona*).

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos estão apresentados no artigo científico submetido a revista *Apidologie*, Springer (Fator de impacto: 2.196). O manuscrito se encontra na fase de revisão (*under review*).

##### **4.1 Capítulo 1: Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple or unique heterochromatin amplification in *Melipona*.**

Mariani Cristina Alves Piccoli, Vanessa Bellini Bardella, Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello

# Apidologie

## Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple or unique heterochromatin amplification in *Melipona* --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	APID-D-17-00089	
<b>Full Title:</b>	Repetitive DNAs in <i>Melipona scutellaris</i> (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple or unique heterochromatin amplification in <i>Melipona</i>	
<b>Article Type:</b>	Original Article	
<b>Keywords:</b>	bee, FISH, heterochromatin, multigene families, repetitive DNAs	
<b>Corresponding Author:</b>	Diogo Cabral-de-Mello  BRAZIL	
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>		
<b>Corresponding Author's Institution:</b>		
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>		
<b>First Author:</b>	Mariani Cristina Alves Piccoli	
<b>First Author Secondary Information:</b>		
<b>Order of Authors:</b>	Mariani Cristina Alves Piccoli Vanessa Bellini Bardella Diogo Cabral-de-Mello	
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>		
<b>Funding Information:</b>	FAPESP (2014/11763-8)	Dr. Diogo Cabral-de-Mello
<b>Abstract:</b>	<p>Bees, which belong to the genus <i>Melipona</i> (Meliponidae), are remarkable due to the high contrast in their heterochromatin amounts and chromosomal distribution, making this group a unique and interesting biological model for the studying repetitive sequence amplification. To better understand the chromosomal organization of repetitive DNAs in <i>Melipona</i> we performed the first efforts for the chromosomal localization of different repetitive DNA in <i>Melipona</i> (<i>Michmelia</i>) <i>scutellaris</i>, a species with high heterochromatic content. Moreover, we tested for unique or multiple heterochromatin amplification in the distinct subgenera. As expected, <i>M. scutellaris</i> presented <math>2n=18</math> (females) and high heterochromatic amounts, which extended along the chromosomal arms. These regions were enriched in repetitive DNAs as demonstrated by C0t-DNA and DOP-PCR probe hybridization. In contrast, these regions were poor in microsatellite repeats (seven motifs), which were accumulated at terminal euchromatic regions, suggesting no relevant role for this class of repetitive DNAs in the genome increasing and heterochromatin amplification. The mapped multigene families, including 18S rDNA and U2 snDNA, were located on distinct chromosomes, pairs 1 and 2, respectively. Dot-blot analysis using a probe for C0t-DNA in <i>M. scutellaris</i> revealed positive hybridization in only two other species from the same subgenus. These data support monophyletic amplification in heterochromatin in <i>Michmelia</i>. However, another subgenus with a high amount of heterochromatin probably underwent independent heterochromatin amplification.</p>	
<b>Suggested Reviewers:</b>	Sebastian Pita spitamim@gmail.com Specialist in insect cytogenetics <hr/> Rodolpho Menezes, Dr	



	<p>rstmenezes@gmail.com Specialist in hymenoptera cytogenetics</p>
	<p>Vladimir Gokhman, Dr vegokhman@hotmail.com Specialis in hymenoptera chromosomes</p>
	<p>Leonela Paladino, Dr carabajal@entu.cas.cz Specialis in insect cytogenetics</p>
<b>Opposed Reviewers:</b>	

June 20 2017

Chief Editor, Apidologie

Dear editor,

This is to submit the manuscript "Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple or unique heterochromatin amplification in *Melipona*" by Picoli et al to be considered for publication in *Apidologie*. I give assurance that the submitted material is original, unpublished work and not under consideration for publication elsewhere, and the co-authors approved the paper for release in *Apidologie* and are in agreement with its content.

With my best wishes,

Dr. Diogo C Cabral-de-Mello

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências

Universidade Estadual Paulista

Rio Claro, SP, Brazil

E-mail: mellodc@rc.unesp.br

1 **Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae):**  
2 **chromosomal distribution and test of multiple or unique heterochromatin**  
3 **amplification in *Melipona***

4

5 Mariani Cristina Alves Piccoli<sup>1</sup>, Vanessa Bellini Bardella<sup>1</sup>, Diogo Cavalcanti Cabral-de-  
6 Mello<sup>1,\*</sup>

7

8 <sup>1</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências/IB, UNESP - Universidade

9 Estadual Paulista, Rio Claro, Brazil

10

11 **\*Corresponding author:** Dr. Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello, Departamento de  
12 Biologia, Instituto de Biociências/IB, UNESP—Universidade Estadual Paulista, CEP  
13 13506-900 Rio Claro, São Paulo, Brazil.

14 E-mail: [mellodc@rc.unesp.br](mailto:mellodc@rc.unesp.br)

15 Telephone: (+55) (19) 3526-4135

16 Fax numbem: (+55) (19) 3526-4136

17

18

19

20

21

22

23

24 **Short title:** Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris*

25 **Abstract**

26 Bees, which belong to the genus *Melipona* (Meliponidae), are remarkable due to the  
27 high contrast in their heterochromatin amounts and chromosomal distribution, making  
28 this group a unique and interesting biological model for the studying repetitive sequence  
29 amplification. To better understand the chromosomal organization of repetitive DNAs  
30 in *Melipona* we performed the first efforts for the chromosomal localization of different  
31 repetitive DNA in *Melipona (Michmelia) scutellaris*, a species with high  
32 heterochromatic content. Moreover, we tested for unique or multiple heterochromatin  
33 amplification in the distinct subgenera. As expected, *M. scutellaris* presented  $2n=18$   
34 (females) and high heterochromatic amounts, which extended along the chromosomal  
35 arms. These regions were enriched in repetitive DNAs as demonstrated by *Cot*-DNA  
36 and DOP-PCR probe hybridization. In contrast, these regions were poor in  
37 microsatellite repeats (seven motifs), which were accumulated at terminal euchromatic  
38 regions, suggesting no relevant role for this class of repetitive DNAs in the genome  
39 increasing and heterochromatin amplification. The mapped multigene families, including  
40 18S rDNA and U2 snDNA, were located on distinct chromosomes, pairs 1 and 2,  
41 respectively. Dot-blot analysis using a probe for *Cot*-DNA in *M. scutellaris* revealed  
42 positive hybridization in only two other species from the same subgenus. These data  
43 support monophyletic amplification in heterochromatin in *Michmelia*. However, another  
44 subgenus with a high amount of heterochromatin probably underwent independent  
45 heterochromatin amplification.

46

47 **Keywords:** bee, FISH, heterochromatin, multigene families, repetitive DNAs

48

49

## 50 **Introduction**

51 Eukaryote genomes are composed of the following two types of repetitive  
52 DNAs: (i) in tandem arranged elements, including satellite DNAs, microsatellites,  
53 minisatellites, and several multigene families; and (ii) scattered elements, which are  
54 represented by transposons and retrotransposons (Charlesworth 1994; Nowak 1994,  
55 López-Flores and Garrido-Ramos 2012; Martins et al. 2007). Due to abundance, easy  
56 isolation and facility in chromosome mapping, these sequences have been used as  
57 markers to understand chromosomal and genome organization and evolution in most  
58 diverse taxa, including some insect groups. However, few studies have been undertaken  
59 in bees (Brito et al. 2005; Rocha et al. 2002; Lopes et al. 2014).

60 Stingless bees (Meliponini) comprise the largest group of highly eusocial insects  
61 with at least 500 species described in pantropical regions and with more than 400  
62 species grouped into 32 genera in the neotropical region (Camargo 2013; Michener  
63 2013). They have great ecological importance as pollinators of native and agricultural  
64 plants (Heard 1999; Pedro 2014). The genus *Melipona* comprises at least 74 species  
65 distributed from Mexico to Argentina (Michener 2007). *Melipona* species have been the  
66 focus of ecological, behavioral, phylogenetic and genetic studies, but studies focused on  
67 their chromosomes are still scarce (Roubik 2006; Rocha et al. 2007; Ramírez et al.  
68 2010; Tavares et al. 2017).

69 Until now, *Melipona* karyotypes had been described for 24 species, displaying a  
70 very conserved chromosome number of  $n=9$  ( $2n=18$ ). This was observed in 23 species;  
71 only two *M. seminigra* subspecies showed  $n=11$ , which probably originated from  
72 fissions in two chromosomes (revised by Tavares et al. 2017). Interestingly, the

73 heterochromatin amounts and chromosomal distribution are highly divergent in  
74 *Melipona*. According to Rocha and Pompolo (1998), they can be divided into two  
75 groups when analyzing by C-banding. One group comprises species with low  
76 heterochromatic content (less than 50%) that is primarily distributed in pericentromeric  
77 regions or in the short chromosomal arms of their chromosomes (Group I). The other  
78 group includes species with high heterochromatic sequence contents, which occupy  
79 almost the entire chromosomes (Group II). The analysis of specific repetitive sequences  
80 composition for *Melipona* chromosomes, which could be important to understand the  
81 causes of heterochromatin variation, was mainly based in fluorochrome staining  
82 (reviewed by Rocha et al. 2007).

83         To better understand the chromosomal distribution of repetitive sequences and  
84 their relationship with eu- or heterochromatin in the genus *Melipona*, we characterized  
85 the chromosomes from *M. (Michmelia) scutellaris*, a species with high heterochromatic  
86 content, using distinct probes for repetitive DNAs. Moreover, to test the hypothesis of  
87 multiple or unique rounds of heterochromatin amplification and dispersion in the  
88 *Melipona* genus, we isolated the pool of repetitive DNAs from *M. scutellaris* and used  
89 probe against genomic DNAs from eight other species belonging to the distinct  
90 subgenera and displaying the distinct heterochromatin distribution.

91

## 92 **Materials and Methods**

93         *M. scutellaris* larvae were obtained from apiary colonies at the Bioscience  
94 Institute at São Paulo State University, Rio Claro/SP. The mitotic chromosomes were  
95 obtained according to Imai et al. (1988) using the cerebral ganglia from post-defective  
96 larvae as the source. Slides were prepared by maceration followed by drying on a plate

97 heated to 45°C. For conventional analyses, the slides were stained with 5% Giemsa for  
98 chromosome counting and heterochromatin detection was performed according to  
99 Sumner (1972).

100 Genomic DNA was obtained from adults using the phenol:chloroform method  
101 (Sambrook and Russel 2001). Multigene families were isolated by Polymerase Chain  
102 Reaction (PCR) using specific primers for the 18S rDNA (Cabral-de-Mello et al. 2010)  
103 and U2 snDNA (Bueno et al. 2013). Two strategies were used to obtain the repetitive  
104 DNA pools, a reassociation kinetics technique (*Cot*) and DOP-PCR. The reassociation  
105 kinetics technique (*Cot*) was performed according to Zwick et al. (1997) with  
106 modifications. Approximately 8 µg of DNA was fragmented with DNase (Sigma-  
107 Aldrich) for one minute. The generated fragments were checked by 1% agarose gel  
108 electrophoresis. The samples were then denatured at 95°C for 10 minutes and incubated  
109 on ice for 10 seconds. Then, the samples were subjected to a reassociation temperature  
110 of 65°C for 10 minutes. After the samples were incubated at 37°C for 8 minutes with S1  
111 nuclease, the reaction was stopped by the addition of liquid nitrogen. The DNA was  
112 purified with phenol:chloroform (1:1, v:v) and the results were confirmed by  
113 electrophoresis on a 1% agarose gel. For amplification by DOP-PCR, a protocol  
114 proposed by Telenius et al. (1992) using the degenerate primer 5'-  
115 CCGACTCGACNNNNNNATCTGG was utilized.

116 The repetitive DNA sequences were labeled with digoxigenin 11-dUTP or biotin  
117 11-dATP by nick translation with PCR or nick-translation. The 19 microsatellite probes  
118 were directly labeled with biotin-14 dATP at the 5'-end during their synthesis (Sigma,  
119 St Louis, MO, USA). Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) followed the protocol  
120 described by Pinkel et al. (1986), with modifications proposed by Cabral-de-Mello et al.

121 (2010), and the probes were detected using anti-digoxigenin-rhodamine (Roche) or  
122 Alexa-fluor-488-conjugated streptavidin (Life Technologies). All the preparations were  
123 stained with DAPI and mounted with Vectashield mounting medium (Vector,  
124 Burlingame, CA, USA). FISH signals were observed using an Olympus BX61  
125 microscope equipped with a fluorescent lamp.

126 To check whether the pools of repetitive DNAs obtained by *Cot*-DNA from *M.*  
127 *scutellaris* are shared with other species from the same genus, we performed dot-blot  
128 analysis according to the protocol described by Anjos et al. (2016). The probe was  
129 tested against genomic DNA from *M. (Michmelia) rufiventris*, *M. (Michmelia)*  
130 *seminigra*, *M. (Eomelipona) bicolor*, *M. (Melikerria) fasciculata* and *M. (Melipona)*  
131 *quadrifasciata*.

132

### 133 **Results and Discussion**

134 The diploid number observed in this study for *M. scutellaris* of  $2n=18$ , female  
135 (Figure 1) was previously reported by Rocha et al. (2007). This condition was also  
136 reported in 22 other species from the same genus, with variant diploid numbers only  
137 occurring in *M. seminigra* when considering the A complement. Like in *Melipona* in  
138 Meliponini, the diploid number conservation is recurrent in the distinct genus, with  
139 slight variations (revised by Tavares et al. 2017).

140 The mapping of repetitive DNAs is scarce in bees, and FISH using multigene  
141 families as a probe in *Melipona* is restricted to major rDNAs in a few species (Rocha et  
142 al. 2002, 2007). The 18S rDNA was located in the terminal region of chromosome 1 in  
143 *M. scutellaris*; this sequence shows heteromorphism in size, as has been reported for  
144 other *Melipona* (Figure 1). One pair harboring an rDNA was also observed in other



145 *Melipona* (Rocha et al. 2002; Rocha 2002) and suggests that this condition is putatively  
146 ancestral. This pattern was also recurring in other Hymenoptera, such as parasitic and  
147 social wasps (Gokhman et al. 2014; Menezes et al. 2013) and ants (Imai et al. 2001).  
148 However, reports of multiple 18S rDNA signals were also described in Hymenoptera, as  
149 in *Partamona* (Meliponini) (Brito et al. 2005), *Diachasmimorpha longicaudata*  
150 (Braconidae) (Paladino et al. 2013) and some parasitoid wasps (Gokhman et al. 2014).  
151 The U2 snDNA was located in pair 2 at the terminal region (Figure 1). This is the first  
152 effort to locate this sequence in Hymenoptera and as well as in some other insects, such  
153 as true bugs (Bardella et al. 2016) and the grasshoppers *Abracris flavolineata* and  
154 *Schistocerca gregaria* (Bueno et al. 2013; Camacho et al. 2015), one bivalent harbor  
155 this sequence, though multiple clusters were also noticed (Palacios-Gimenez et al. 2013;  
156 Castillo et al. 2017). The use of this probe in other *Melipona* and Hymenoptera will  
157 elucidate the organization and evolution patterns of this sequence, which could be a  
158 good tool for understanding chromosome evolution.

159         The heterochromatin was distributed along the chromosomal arms, except in the  
160 terminal regions (Figure 2a), which has been observed in other colonies and is  
161 putatively caused by high heterochromatin additions (Rocha and Pompolo 1998; Rocha  
162 et al. 2002; Rocha et al. 2007). According to Rocha et al. (2002), this could represent a  
163 main chromosomal evolution event in bees. The differences in the heterochromatin  
164 amounts and distribution are remarkable aspects of *Melipona*, and Rocha and Pompolo  
165 (1998) divided the genus into two groups (see introduction). Species with high  
166 heterochromatic contents also display larger genome sizes, such as *M. scutellaris*,  
167 whose genome is 1.08 pg (Tavares et al. 2010). The notion of the amplification of  
168 repetitive DNAs, which is associated with large heterochromatic blocks, is reinforced in

169 this work by the analysis of the DOP-PCR and *Cot*-DNA fraction probe hybridization  
170 that labeled the same regions corresponding to heterochromatin (Figures 2b and c).

171 In contrast to the mapping with the *Cot*-DNA and DOP-PCR probes, seven  
172 microsatellite repeats revealed enrichment in the euchromatic regions, though faint  
173 scattered signals were also observed in the heterochromatin. No apparent variability in  
174 density was observed in the distinct chromosomes (Figure 3). Among Meliponidae,  
175 there is no data regarding the cytogenetic mapping of microsatellite repeats. In other  
176 insects, euchromatic locations for some microsatellite distinct repeats have been  
177 reported, such as in grasshoppers (Milani and Cabral-de-Mello 2014; Ruiz-Ruano et al.  
178 2015; Palacios-Gimenez et al. 2015). In the Hymenoptera model species *Nasonia*  
179 *vitripennis*, the microsatellite composition, abundance and density in distinct  
180 chromosomes were analyzed using genomic data. The data contrasted with observations  
181 in this study based on the density heterogeneity of microsatellites in the five  
182 chromosomes from this species. Moreover, considering the heat map for the  
183 chromosomal distribution of microsatellites, there are no common regions with higher  
184 microsatellite density (Pannebakker et al. 2010) as observed for the distal euchromatic  
185 regions in *M. scutellaris*. It is known that the presence of several microsatellites  
186 contributes to increased genome sizes in many organisms, such as in the grasshopper  
187 *Chorthippus biguttulus* (Ustinova et al. 2006) and has been observed in *Arabidopsis*  
188 *thaliana* and *Drosophila melanogaster* (Katti et al. 2001). Considering the enrichment  
189 for microsatellites in *M. scutellaris* euchromatin and the increased genome related to  
190 heterochromatin, we can speculate that this class of repetitive DNAs plays a minor role  
191 in increasing the genome size in this species. Moreover, the microsatellite mapping  
192 indicates the sharing of repetitive DNAs enriched in euchromatin (C-negative regions),

193 similar to what was observed for *M. rufiventris* heterochromatin (Lopes et al. 2014).  
194 Putatively, the repetitive DNAs associated with heterochromatin amplification in *M.*  
195 *scutellaris* are satDNAs and transposable elements, which are generally isolated in *Cot*-  
196 DNA fractions. However, as this DNA fraction is anonymous, specific sequences  
197 should be characterized.

198 *Melipona* species with high heterochromatin amounts are placed into two  
199 distinct subgenera (*Michmelia* and *Melikerria*). According to the molecular  
200 phylogenetic hypothesis (Ramírez et al. 2010) these subgenera are less related than with  
201 a subgenus presenting low heterochromatin (*Eomelipona*). Considering this situation, it  
202 is possible that heterochromatin amplification occurred more than once in the genus,  
203 which has been proposed by Lopes et al. (2011) based in phylogenetic data. Our data  
204 using dot-blot hybridization shed light on this question. Membrane hybridization using  
205 the *Cot*-DNA fraction of *M. scutellaris* as a probe against the genomes of some  
206 *Melipona* species (*M. rufiventris*, *M. seminigra*, *M. bicolor*, *M. fasciculata* and *M.*  
207 *quadrifasciata*) only showed positive hybridization to *M. rufiventris*, *M. seminigra*,  
208 species belonging to the same subgenus (*Michmelia*) (Figure 4a). These data support the  
209 presence of monophyletic heterochromatin amplification in *Michmelia* but also suggest  
210 more than one round of amplification in *Melipona*. Although the pool of repetitive  
211 DNAs is shared between *Michmelia* species, the specific sequences responsible for  
212 heterochromatin amplification should be better investigated. This is an interesting issue  
213 to be investigated in the future and will allow for a more conclusive hypothesis for the  
214 causes of heterochromatin amplification in this genus.

215

216 **Acknowledgements**

217 This study was partially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do  
218 Estado de São Paulo (FAPESP) (process number 2014/11763-8), Coordenadoria de  
219 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de  
220 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). DCCM was the recipient of a  
221 research productivity fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento  
222 Científico e Tecnológico-CNPq (process number 304758/2014-0), VBB was recipient  
223 of PNPd/CAPES scholarship and MCAP was recipient of CAPES scholarship.

224

#### 225 **Authors contribution**

226 DCCM conceived the study and designed experiments; MCAP and VBB  
227 performed experiments; MCAP, VBB and DCCM interpreted of the data and wrote the  
228 manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

229

#### 230 **Conflict of interest**

231 The authors declare that they have no potential conflict of interest in relation to  
232 the study in this paper.

233

#### 234 **References**

- 235 Anjos, A., Rocha, G.C., Paladini, A., Mariguela, T.C., Cabral-de-Mello, D.C. (2016)  
236 Karyotypes and repetitive DNA evolution in six species of the genus *Mahanarva*  
237 (Auchenorrhyncha: Cercopidae). *Cytogenet. Genome Res.* **149**, 321-327
- 238 Bardella, V.B., Fernandes, J.A.M., Cabral-de-Mello, D.C. (2016) Chromosomal  
239 evolutionary dynamics of four multigene families in Coreidae and Pentatomidae  
240 (Heteroptera) true bugs. *Mol. Genet. Genomic* **291**, 1919-1925

241 Brito, R.M., Pompolo, S.G., Magalhães, M.F.M., Barros, E.G., Sakamoto-Hojo, E.T.  
242 (2005) Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae,  
243 Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18S rDNA clusters by FISH.  
244 *Cytologia* **70** (4), 373-380

245 Bueno, D., Palacios-Gimenez, O.M., Cabral-de-Mello, D.C. (2013) Chromosomal  
246 mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible  
247 ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. *PLoS One* **8** (6), e66532

248 Cabral-de-Mello, D.C., Moura, R.C., Martins, C. (2010) Chromosomal mapping of  
249 repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an  
250 association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity  
251 between the B chromosome and A complement. *Heredity* **104**, 393-400

252 Camacho, J.P.M., Ruiz-Ruano, J., Martin-Blázquez, R., López-León, M.D., Cabrero, J.,  
253 Lorite, P., Cabral-de-Mello, D.C.; Bakkali, M. (2015) A step to the gigantic genome of  
254 the desert locust: chromosomes sizes and repeated DNAs. *Chromosoma* **124** (2), 263-  
255 275

256 Camargo, J.M.F. (2013) Historical biogeography of the Meliponini (Hymenoptera,  
257 Apidae, Apinae), in: Vit, P., Pedro, S. R. M., Roubik, D. (Eds.) *Pot-Honey: A legacy of*  
258 *stingless bees*. Springer-Verlag, New York, pp. 19-34

259 Castilho, E.R.D., Taffarel, A., Maronna, M.M., Cigiliano, M.M., Palacios-Gimenez, O.  
260 M., Cabral-de-Mello, D. C., Martí, D. A. (2017) Phylogeny and chromosomal  
261 diversification in the *Dichroplus elongates* species group (Orthoptera, Melanoplinae).  
262 *PLoS One* **12** (2), e0172352

263 Charlesworth, B., Snlegowski, P., Stephan, W. (1994) The evolution dynamics of  
264 repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* **371** (6494), 215-220

265 Gokhman, V.E., Anokhin, B.A., Kuznetsova, V.G. (2014) Distribution of 18S rDNA  
266 sites and absence of the canonical TTAGG insect telomeric repeat in parasitoid  
267 Hymenoptera. *Genetica* **142** (4), 317-322

268 Heard, T.A. (1999) The role of stingless bees in crop pollination. *Annu. Rev. Entomol.*  
269 **44**, 183-206

270 Imai, H.T., Taylor, R.W., Crossland, M.W.L., Crozier, R.H. (1988) Modes of  
271 spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to  
272 minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.* **63** (2), 159-185

273 Imai, H.T., Satta, Y., Takahana, N. (2001) Integrative study on chromosome evolution  
274 of mammals, ants and wasps based on the minimum interaction theory. *J. Theor. Biol.*  
275 **210** (4), 475-497

276 Katti, M.V., Ranjekar, P.K., Gupta, V.S. (2001) Differential distribution of simple  
277 sequence repeats in Eukaryotic genome sequences. *Mol. Biol. Evol.* **18** (7), 1161-1167

278 Lopes, D.M., Fernandes, A., Praça-Fontes, M.M., Werneck, H.A., Resende, C.,  
279 Campos, L.A.O. (2011) Cytogenetics of three *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae,  
280 Meliponini). *Sociobiology* **57** (2)

281 Lopes, D.M., Fernandes, A., Diniz, D., Sobrinho Scudeler, P.E., Foresti, F., Oliveira  
282 Campos, L. A. (2014) Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees  
283 (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. *Caryologia* **67** (3), 222-  
284 226

285 López-Flores, I., Garrido-Ramos, M.M. (2012) The repetitive DNA content of  
286 eukaryotic genomes. *Cytogenet. Genome Res.* **7**, 1-28

287 Martins, C. (2007) Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge  
288 of fish genome. In: Pizano, E., Ozouf-Costaz, C., Forest, F., Kapoor, B.G. Fish  
289 Cytogenetics, Science Published, Hauppauge, p. 421-453

290 Menezes, R.S.T., Silva, T.M., Carvallho, A.F., Andrade-Souza, V., Silva, J.G., Costa,  
291 M.A. (2013) Numerical and structural chromosome variation in the swarn-founding  
292 wasp *Metapolybia decorata* Gribodo 1896 (Hymenoptera, Vespidae). *Genetica* **141** (7-  
293 9), 273-280

294 Michener, C.D. (2007) The bees of the world. Johns Hopkins University Press,  
295 Baltimore.

296 Michener, C.D. (2013) The Meliponini, in: Vit, P., Pedro, S.R.M., Roubik, D. (Eds.)  
297 Pot-Honey: A legacy of stingless bees. Springer-Verlag, New York, pp. 19-34

298 Milani, D., Cabral-de-Mello, D.C. (2014) Microsatellite organization in the grasshopper  
299 *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable  
300 spreading in the A and B chromosomes. *PLoS One* **9** (5), e97956

301 Nowak, R. (1994) Mining Treasures From 'Junk DNA'. *Science* **263**, 608-610

302 Palacios-Gimenez, O.M., Castilho, E.R., Marti, D.A., Cabral-de-Mello, D.C. (2013)  
303 Tracking the evolution of sex chromosome systems in *Melanoplinae* grasshoppers  
304 through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. *BMC Evol. Biol.* **13**,167

305 Palacios-Gimenez, O.M., Cabral-de-Mello, D.C. (2015) Repetitive DNA chromosomal  
306 organization in the cricket *Cycloptiloides americanus*: a case of the unusual X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>0 sex  
307 chromosomes system in Orthoptera. *Mol. Genetic Genomics* **290**, 623-631

308 Paladino, L.C., Papeschi, A., Lanzavecchia, S., Cladera, J., Bressa, M.J. (2013)  
309 Cytogenetic charactezation of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera:

310 Braconidae), a parasitoid wasp used as a biological control agente. Eur. J. Entomol. **110**  
311 (3), 401-409

312 Pannebakker, B.A., Niehuis, O., Hedley, A., Gadau, J., Shuker, D.M. (2010) The  
313 distribution of microsatellites in the *Nasonia* parasitoid wasp genome. Insect Mol. Biol.  
314 **19** (1), 91-98

315 Pedro, S.R.M. (2014) The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera:Apidae).  
316 Sociobiology **61** (4), 348-354

317 Pinkel, D., Straume, T., Gray, J.W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative,  
318 high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **83** (9), 2934-  
319 2938

320 Ramirez, S.R., Nieh, J.C., Quental, T.B., Roubik, D.W., Imperatriz-Fonseca, V. L.,  
321 Pierce, N. E. (2010) A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona*  
322 (Hymenoptera: Apidae). Mol. Phylogenet. Evol. **56** (2), 519-525

323 Rocha, M.P., Pompolo, S.G. (1998) Karyotypes and heterochromatin variation (C-  
324 bands) in *Melipona* species (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINAE). Genet.  
325 Mol. Biol. **21** (1)

326 Rocha, Marla Piumbini. Análises citogenéticas em abelhas do gênero *Melipona*  
327 (Hymenoptera, Meliponini). 2002, 84 f. Dissertação (Doutorado em Biologia Celular e  
328 Estrutural) – Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade  
329 Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

330 Rocha, M.P., Pompolo, S.G., Dergam, J.A., Fernandes, A., Campos, L.A.O. (2002)  
331 DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona*  
332 (Hymenoptera, Meliponini). Hereditas **136**, 19-27



333 Rocha, M.P., Pompolo, S.G., Fernandes, A., Campos, L.A.O. (2007) *Melipona*: seis  
334 décadas de citogenética. *J. Biosci.* **23**, 182-276

335 Roubik, D.W. (2006) Stingless bee nesting biology. *Apidologie* **37** (2), 124-143

336 Ruiz-Ruano, F.J., Cuadrado, A., Montiel, E.E., Camacho, J.P., López-Leon, M.D.  
337 (2015) Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom  
338 microsatellite distribution in two grasshopper genomes. *Chromosoma* **124** (2), 221-234

339 Sambrook, J., Russel, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold  
340 Spring Harbor Laboratory Press, New York.

341 Sumner, A.T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric  
342 heterochromatin. *Exp. Cell Res.* **75** (1), 304-306

343 Tavares, M.G., Carvalho, C.R., Soares, F.A.F. (2010) Genome size variation in  
344 *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) and sub-grouping by their DNA contente.  
345 *Apidologie* **41** (6), 636-642

346 Tavares, M.G., Lopes, D.M., Campos, L.A.O. (2017) An overview of cytogenetics of  
347 the tribe Meliponini (Hymenoptera: Apidae). *Genetica* **145** (3), 241-258

348 Telenius, H., Carter, H.P., Bebb, C.E., Nordenskjöld, M., Ponder, P.A. Tunnacliffe, A.  
349 (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA  
350 by a single degenerate primer. *Genomics* **13** (3), 718-725

351 Ustinova, J., Achmann, R., Cremer, S., Mayer, F. (2006) Long repeats in a huge  
352 genome: Microsatellite loci in the grasshopper *Chorthippus biguttulus*. *J. Mol. Evol.* **62**  
353 (2), 158-167

354 Zwich, M.S., Hanson, R.E., Mcknight, T.D. Islam-Faridi, H.M., Stelly, D.M., Wing, R.  
355 A., Price, J.H. (1997) A rapid procedure for the isolation of *Cot-1* DNA from plants.  
356 *Genome* **40** (1), 138-142

357

358 **Figure captions**

359 Figure 1. Fluorescence *in situ* hybridization using 18S rDNA (green) and U2 snDNA  
360 (red) as probes in *Melipona scutellaris* chromosomes. Note, the hybridization signals  
361 are present in the terminal regions of the distinct chromosome pairs.

362

363 Figure 2. *Melipona scutellaris* mitotic chromosomes. (a) C-banding shows evidence of a  
364 large amount of heterochromatin. (b) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using  
365 the *Cot* fraction as a probe and (c) FISH with the DOP-PCR probe. Note the spread  
366 marks along the heterochromatic regions.

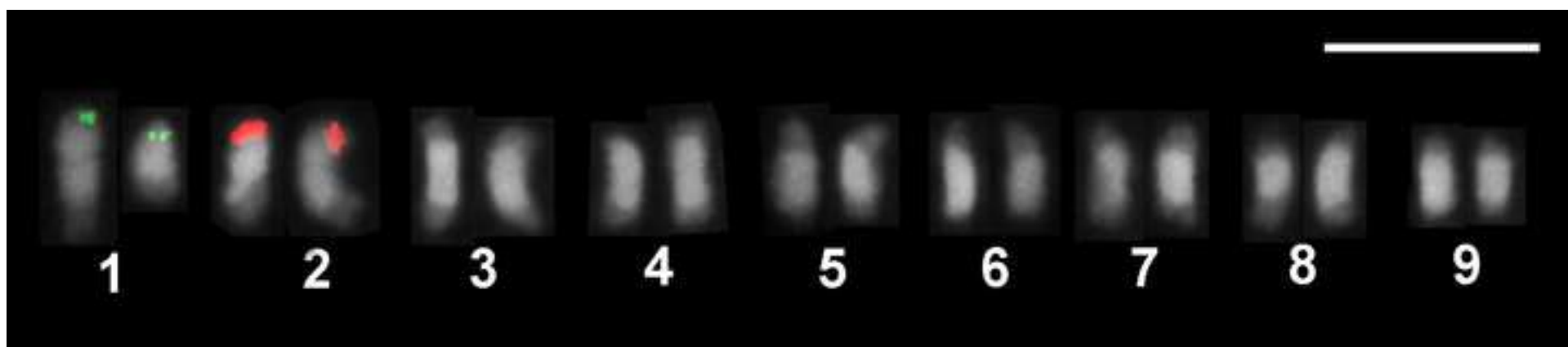
367

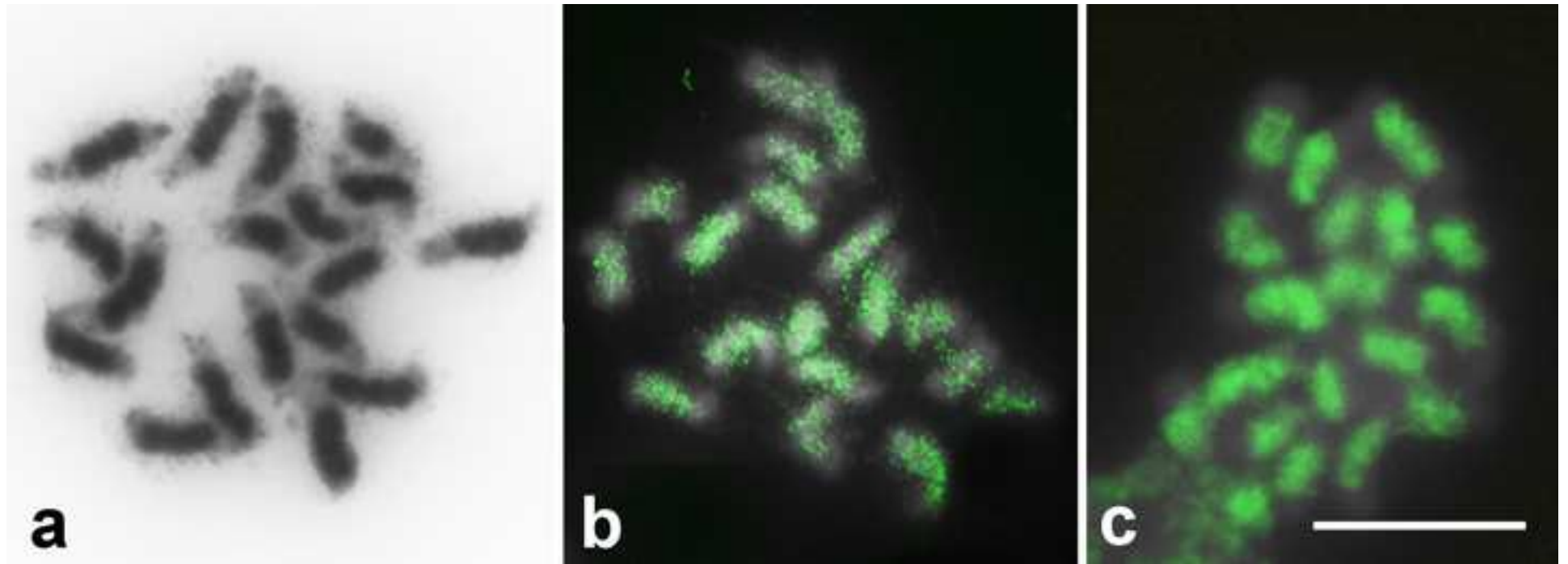
368 Figure 3. FISH with microsatellites probes. Observe the hybridization signals in the  
369 terminal euchromatic regions.

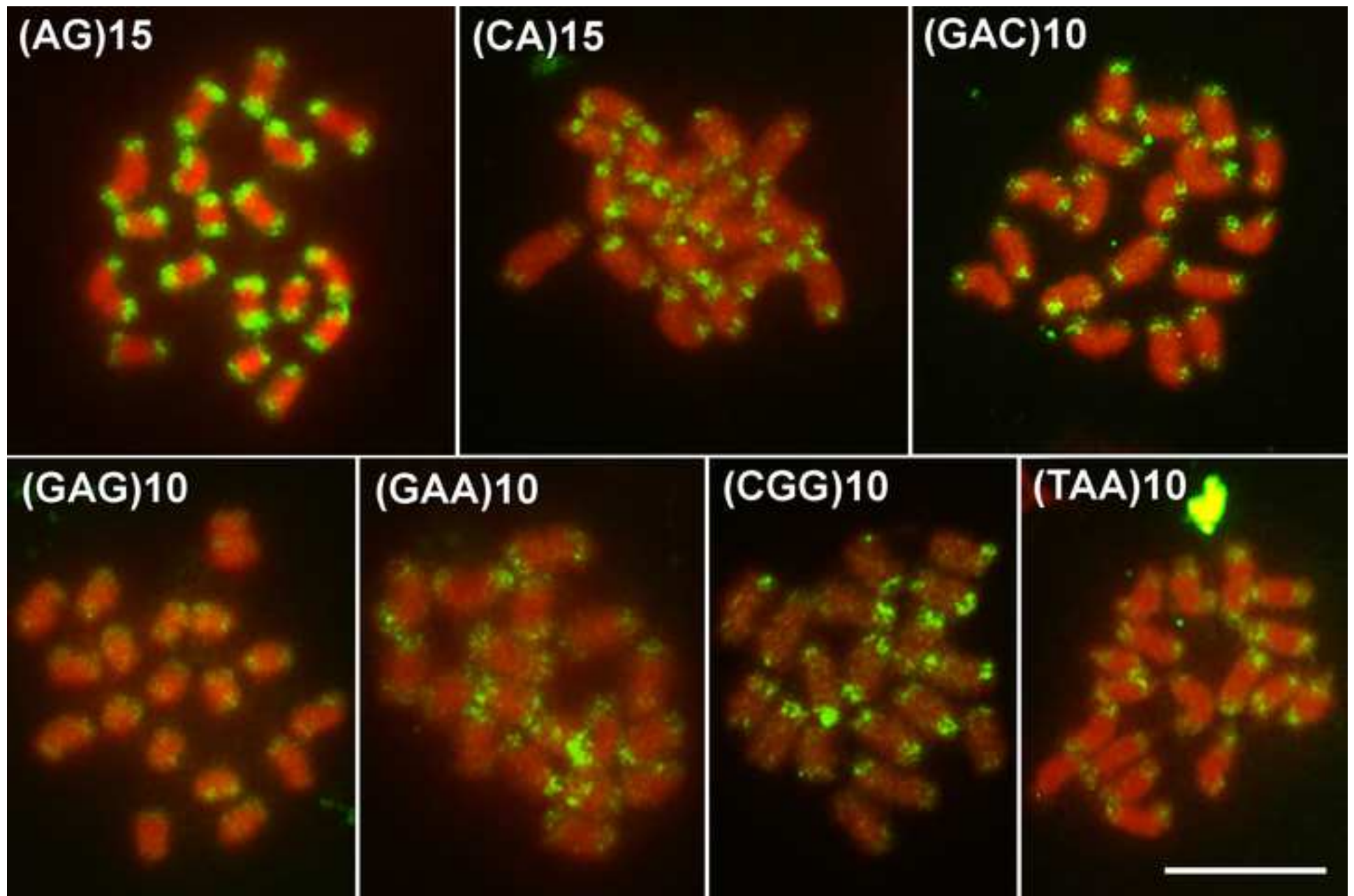
370

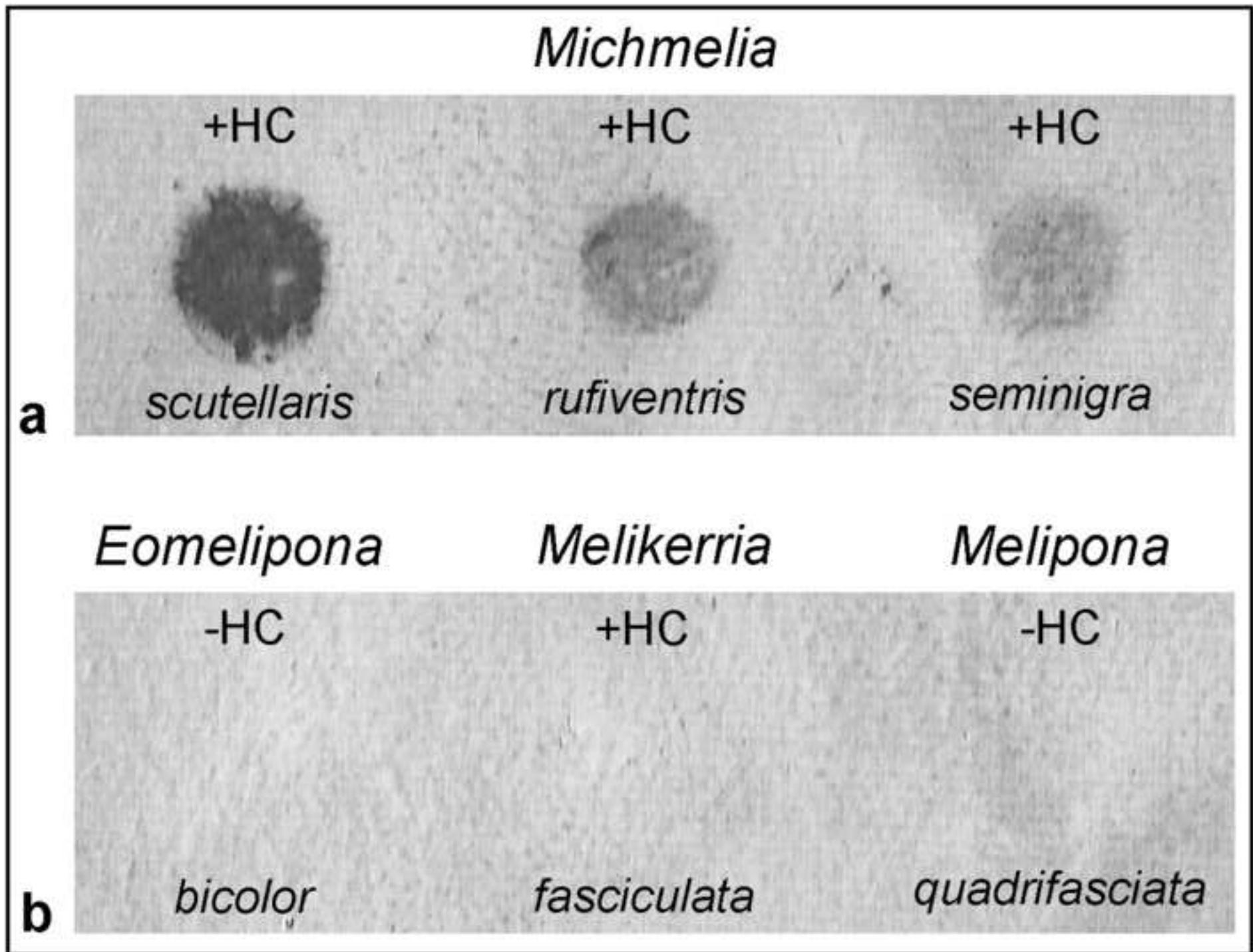
371 Figure 4. Dot-blot hybridization using *M. scutellaris* *Cot*-DNA fraction as a probe in  
372 species from the *Melipona* genus groups, group-I and group-II. (a) Note the positive  
373 signals in *M. rufiventris* and *M. seminigra*, which belong to the subgenus *Michmelia*  
374 and have high heterochromatin contents. (b) Note the absence of signals in species  
375 belonging to the other subgenus, including a species with high heterochromatic content,  
376 *M. (Melikerria) fasciculata*. Species with high heterochromatin content are identified by  
377 (+HC) while species with low heterochromatin amount by (-HC).

378









## 5. CONCLUSÕES FINAIS

- O número cromossômico encontrado de  $2n=18$  (fêmeas) corresponde ao frequentemente relatado para o grupo e o mesmo se apresenta muito conservado dentro do gênero *Melipona*.
- A análise da banda-C confirmou que *M. scutellaris* possui cromossomos com grande quantidade de heterocromatina distribuída e apenas regiões terminais são eucromáticas. Além disso, a fração *Cot* e DOP-PCR mostraram hibridização positiva em toda heterocromatina da espécie demonstrando que a mesma é constituída por sequências de DNAs repetitivos, porém essas sequências são ainda anônimas necessitando de uma caracterização.
- Nas sequências de DNA repetitivo analisadas podemos ver sinais de hibridização positivos para DNAr 18S (primeiro par), DNAsn U2 (segundo par) e 7 sondas microssatélites (todos os cromossomos) sendo que todos os sinais apareceram nas regiões terminais dos cromossomos que são eucromáticas evidenciando que as sequências testadas não estão relacionadas com o aumento do tamanho genômico e à amplificação da heterocromatina para a espécie *Melipona scutellaris*.
- Nós observamos também que apesar dos subgrupos *Michmelia* e *Melikerria* possuírem grande quantidade de heterocromatina, as sequências que compõem tal heterocromatina diferem para cada subgrupo. Com essa observação a respeito da similaridade/diferença da heterocromatina, podemos dizer que houve uma amplificação desta fração genômica monofilética no subgrupo *Michmélia*, porém a amplificação da heterocromatina aconteceu mais de uma vez no gênero *Melipona* como um todo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANLEITNER, J.E.; HAYMER, D.S.Y. Enriched and Y specific DNA sequences from the Genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. **Chromosoma**, v. 101, n. 5, p. 271-278, 1992.
- ANJOS, A.; ROCHA, G.C.; PALADINI, A.; MARIGUELA, T.C.; CABRAL-DE-MELLO, D.C. Karyotypes and repetitive DNA evolution in six species of the genus *Mahanarva* (Auchenorrhyncha: Cercopidae). **Cytogenetic Genome Research**, v. 149, n. 4, p. 321-327, 2016.
- BARDELLA, V.B.; FERNANDES, J.A.M.; CABRAL-DE-MELLO, D.C. Chromosomal evolutionary dynamics of four multigene families in Coreidae and Pentatomidae (Heteroptera) true bugs. **Molecular Genetic and Genomic**, v. 291, n. 5, p. 1919-1925, 2016.
- BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, n. 7111, p. 521-524, 2006.
- BRINGMANN, P.; LÜHRMANN, R. Purification of the individual snRNPs U1, U2, U5 and U4/U6 from HeLa cells and characterization of their protein constituents. **The EMBO Journal**, v. 5, n. 13, p. 3509–3516, 1986.
- BUENO, D.; PALACIO-GIMENEZ, O.M.; CABRAL-DE-MELLO, D.C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry for the B chromosome and surprisingly H3 histone spreading. **PloS ONE**, v. 8, n. 6, p. 66532, 2013.
- BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N. J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **BioEssays**, v. 28, n. 10, p. 1040-1050, 2006.
- CABRAL-DE MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 104, n. 4, p. 333-400, 2010.
- CAMARA, J. Q.; SOUSA, A. H.; VASCONCELOS, W. E.; FREITAS, R. S.; MAIA, P. H. S.; ALMEIDA, J. C.; MARACAÇA, P. B. Estudos de Meliponíneos, com ênfase a *Melipona subnitida* D. no município de Jandacaia, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 1, 2004.
- CAMARGO, J.M.F. Historical biogeography of the Meliponini (Hymenoptera, Apidae, Apinae). In: VIT, P.; PEDRO, S.R.M.; ROUBIK, D. (Eds.) Pot-Honey: A legacy of stingless bees. Springer-Verlag, New York, p. 19-34. 2013.
- CHARLESWORTH, B.; SNLEGOWSKL, P.; STEPHAN, W. The evolution dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215-220, 1994.
- EICKBUSH; T.H.; EICKBUSH, D.G. Finely orchestrated movemensts: evolution of the ribosomal RNA genes. **Genetics**, v. 175, n. 2, p. 477-485, 2007.
- FEDOROFF, N. Transposable elements, epigenetics, and genome evolution. **Science**, v. 338, n. 6108, p. 758-759, 2012.
- GREGORY, T.R. Genome size and developmental complexity. **Genetica**, v. 115, n. 1, p. 131-146, 2002.



- GREGORY, T.R. **The evolution of the genome**. Academic Press, 2005. 768 p.
- HEARD, T.A. The role of stingless bees in crop pollination. *Annual Review Entomology*, v. 44, p. 183-206, 1999.
- HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, v. 66, n. 4, p. 411-453, 1991.
- IMAI, H.T.; TAYLOR, R.W.; CROSSLAND, M.W.L.; CROZIER, R.H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to minimum interaction hypothesis. **The Japanese journal of genetics**, v. 63, n. 2, p. 159-185, 1988.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, v. 314, n. 6006, p. 67-73, 1985.
- JURKA, J.; KAPITONOV, V.V.; KOHANY, O.; JURKA, M.V. Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. **Annual Review Genomics Human Genetics**, v. 8, p. 241-259, 2007.
- KERR, W.E. Estudos sobre o gênero *Melipona*. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 5, p. 182-276, 1948.
- KERR, W.E.; PISANI, J.F.; AILY, D. Aplicação de princípios modernos à sistemática do gênero *Melipona* Illiger, com a divisão em dois subgêneros (Hymenoptera, Apoidea). **Papeis Avulsos de Zoologia**, v. 20, n. 13, p. 135-145, 1967.
- KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; NASCIMENTO, V.A. **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação**. Belo Horizonte, Fundação Acangaú, 1996. 144 p.
- KIDWELL, M. Transposable elements and the evolution of Dipterans genomes. In: YEATES, D.K.; WIEGMANN, B.M. (Eds). **The evolutionary Biology of Flies**, New York: Columbia University Press. p. 145, 2005.
- KRAEMER, C.; SCHMIDT, E.R. The sex determining region of *Chironomus thummi* is associated with highly repetitive DNA and transposable elements. **Chromosoma**, v. 102, n. 8, p. 553-562, 1993.
- KUHN, G.C.S. Satellite DNA transcripts have diverse biological roles in *Drosophila*. **Heredity**, v. 115, n. 1, p. 1-2, 2015.
- LASALLE, J.; GAULD, I.D. Hymenoptera: their biodiversity, and their impact on the diversity of other organisms. **Hymenoptera and Biodiversity**, p. 1-26, 1993.
- LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular ecology**, v. 11, n. 12, p. 2453-2465. 2002.
- LONG, E.O.; DAWID, I.D. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 727-764, 1980.
- LOPES, D.M.; FERNANDES, A.; DINIZ, D.; SCUDELER, P.E.S.; FORESTI, F.; CAMPOS, L.A.O. Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. **Caryologia**, v. 67, n. 3, p. 222-226, 2014.

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M.A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. In: GARRIDO-RAMOS, M.A. (ed): Repetitive DNA. **Genome Dynamics**, Karger, p. 1-28, 2012.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. **Fish cytogenetics**, p. 421-453, 2007.

MEDSTRAND, P.A.; VAN DE LAGEMAAT, L.N.B.; DUNN, C.A.B.; LANDRY, J.R.B.; SVENBACK, D.A.; MAGER, D.L.B. Impact of transposable elements on the evolution of mammalian gene regulation. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, n. 1-4, p. 342-352, 2005.

MICHENER, C.D. **The bees of the world**. ed. 2. Baltimore: Johns Hopkins University Press. 2007. 925 p.

MICHENER, C.D. The Meliponini. In: VIT, P.; PEDRO, S.R.M.; ROUBIK, D. (Eds.) Pot-Honey: A legacy of the stingless bees. Springer-Verlag, New York, p. 3-17, 2013.

MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D.C. Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes. **PloS One**, v.9, n. 5, e97956, 2014.

MOURE, J.S. *Melikerria e Eomelipona*, dois subgêneros novos em *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera: Apidae). **Naturalia**, p. 32-38, 1992.

NEI, M.; ROONEY, A.P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 121-152, 2005.

NOWAK, R. Mining Treasures From 'Junk DNA'. **Science**, v. 263, n. 5147, p. 608-610, 1994.

PEDRO, S.R.M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348-354, 2014.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceeding National Academy of Sciences USA**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.

PLOHL, M.; LUCHETTI, A.; MESTROVIC, N.; MANTOVANI, B. Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. **Gene**, v. 409, n. 1, p. 72-82, 2008.

RAMEL, C. Mini-and microsatellites. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, n. Suppl 4, p. 781, 1997.

ROCHA, M. P.; POMPOLO S. G. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 1, p. 41-45, 1998.

ROCHA, M.P. **Análises citogenéticas em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini)**. 2002, 84 f. Dissertação (Dourado em Biologia Celular e Estrutural) – Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ROCHA, M. P.; POMPOLO, S. G.; DERGAM, J. A.; FERNANDES, A.; CAMPOS, L. A. O. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera,

- Meliponini). **Hereditas**, v. 136, n. 1, p. 19-27, 2002.
- ROCHA, M. P.; CRUZ, M. P.; FERNANDES, A.; WALDSCHMIDT, A. M.; SILVA-JUNIOR, J. C.; POMPOLO, S. G. Longitudinal differentiation in *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini) chromosomes. **Hereditas**, v. 138, n. 2, p. 133-137, 2003.
- ROCHA, M. P.; POMPOLO, S. G.; FERNANDES, A.; CAMPOS, L. A. O. *Melipona*: seis décadas de Citogenética. **Bioscience Journal**, v. 23, p. 182-276, 2007.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 3, 2001.
- SCHUELER, M.G.; HIGGINS, A.W.; RUDD, M.K.; GUSTASHAW, K.; WILLARD, H.F. Genomic and genetic definition of a functional human centromere. **Science**, v. 294, n. 5540, p. 109-115, 2001.
- SHAPIRO, J.A.; von STERNBERG, R. Why repetitive DNA is essential to genome function. **Biological Reviews**, v. 80, n. 2, p. 227-250, 2005.
- SMITH, C.D.; SHU, S.Q.; MUNGALL, C.J.; KARPEN, G.H. The release 5.1 annotation of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. **Science**, v. 316, n. 5831, p. 1586-1591, 2007.
- STEINEMANN, S.; STEINEMANN, M. Y chromosomes: born to be destroyed. **BioEssays**, v. 27, n. 10, p. 1076-1083, 2005.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, n. 1, p. 304-306, 1972.
- TAVARES, M.G.; CARVALHO, C.R.; SOARES, F.A.F. Genome size variation in *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) and sub-grouping by their DNA content. **Apidologie**, v. 41, n. 6, p. 636-642, 2010.
- TAVARES, M.G.; LOPES, D.M.; CAMPOS, L.A.O. An overview of cytogenetics of the tribe Meliponini (Hymenoptera: Apidae). **Genetica**, v. 145, n. 3, p. 241-258, 2017.
- TELENIUS, H.; PONDER, B.A.J.; TUNNACLIFFE, A.; PELMEAR, A.H.; CARTER, N.P.; FERGUSON-SMITH, M.A.; BEHMEL, A.; NORDENSKJOLD, M.; PFRAGNER, A. Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 4, n. 3, p. 257-263, 1992.
- VALADKHAN, S. snRNAs as the catalysts of pre-mRNA splicing. **Current opinion in chemical biology**, v. 9, n. 6, p. 603-608, 2005.
- VIT, P.; PEDRO, S.R.M.; ROUBIK, D.W. **Pot-Honey**: A legacy of stingless bees. Springer New York. 2013. 654 p.
- WEST, S. The increasing functional repertoire of U1 snRNA. **Biochemical Society transactions**, v. 40, p. 846-849, 2012.
- YOSHIMURA, A.; NAKATA, A.; MITO, T.; NOJI, S. The characteristics of karyotype and telomeric satellite DNA sequences in the cricket, *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 112, n. 3-4, p. 329-336, 2006.
- ZWICK, M.S.; HANSON, R.E.; MCKNIGHT, T.D. ISLAM-FARIDI, H.M.; STELLY, D.M.;

WING, R.A. PRICE, J.H. A rapid procedure for the isolation of C<sub>0</sub>t-1 DNA from plants.  
**Genome**, v. 40, n.1, p. 138-142, 1997.